

UNTERSUCHUNGEN ZUR PRÄFERENTIELLEN HEMMUNG
DER BIPHENYLHYDROXYLIERUNG
IN RATTENLEBERMIKROSOMEN

TERESA GALINSKY
—

1976
—

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur präferentiellen Hemmung der
Biphenylhydroxylierung in Rattenlebermikrosomen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Teresa Galinsky

aus Tübingen

Mainz 1976

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. P. Klein

1. Gutachter:

Professor Dr. G.F. Kahl

2. Gutachter:

Professor Dr. K.J. Netter

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Oktober 1976

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLECHEN 1 · RUF 0 61 32 / 57 11



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Ziel der Arbeit	6
Methoden	7
I. Herstellung der Mikrosomenfraktion	7
1. Vorbehandlung	7
2. Aufbereitung	7
3. Eiweißbestimmung	8
II. Enzymatische Bestimmungen	9
1. Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase-Bestimmung - Beeinflussung durch Metyrapon und α -Naphthoflavin	9
2. Biphenylhydroxylierung - Beeinflussung durch Metyrapon und α -Naphthoflavin	10
III. Messung der oxydativen Bindungskonstanten	13
1. Bindung von α -Naphthoflavin	13
2. Bindung von Metyrapon	15
IV. Chemikalien	16
V. Statistische Auswertung	17
Ergebnisse	18
1. Induktion der Biphenyl-Hydroxylase in Rattenlebermikrosomen	18
2. Einfluß von Metyrapon auf die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten	19
3. Einfluß von α -Naphthoflavin auf die Aryl-Hydrocarbon-hydroxylase in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten	20
4. Einfluß von α -Naphthoflavin auf die Biphenylhydroxylierung in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten	22
5. Einfluß von Metyrapon auf die Biphenylhydroxylierung in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten	25

6. Oxydative Bindungskonstanten von α -Naphthoflavin in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten	28
7. Oxydative Bindungskonstanten von Metyrapon in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten	28
Diskussion	31
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44

Liste der Abkürzungen

PB = Phenobarbital

3-MC = 3-Methylcholanthren

AHH = Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase

2,3,7,8, TCDD = 2,3,7,8, Tetrachlor-Dibenz-p-Dioxin

BP = Benzpyren

ANF = α -Naphthoflavin

DMF = Dimethylformamid

MP = Metyrapon

MFO = Mischfunktionelle Oxydase



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Nach der Entdeckung eines CO-bindenden Pigmentes in Schweinelebermikrosomen durch Garfinkel (1958) und der näheren Klassifizierung dieses Pigmentes (Omura und Sato, 1964) als Hämoprotein, das in seiner reduzierten Form nach CO-Begasung im Differenzspektrum ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 450 nm zeigt und daher den Namen P450 erhielt, folgten in kurzen Abständen Untersuchungen über weitere Eigenschaften dieses mikrosomalen Pigmentes. So nahmen Schenkman et al. (1967) eine Einteilung der Fremdstoffe, die an Lebermikrosomen gebunden werden, in Typ I- und Typ II-Substrate entsprechend der Lage ihrer Absorptionsmaxima und -minima im Differenzspektrum bei 390/420 (Typ I) und 430/390 (Typ II) vor. Auch die zentrale Bedeutung von Cytochrom P450 bei der Metabolisierung - insbesondere Hydroxylierung - von Steroiden (Kuntzman et al., 1964), Fettsäuren (Lu und Coon, 1968), Arzneimitteln (Conney, 1967) und anderen Fremdstoffen und die Abhängigkeit dieser Reaktionen von NADPH als Startsubstanz für eine vorgeschaltete Elektronentransportkette wurde bald erkannt (Ernster und Orrenius, 1965). Um weitere Erkenntnisse über das Hämoprotein P450 zu gewinnen, beschränkt man zwei grundsätzlich verschiedene Wege: (A) Erforschung der Induktion des Enzymsystems und (B) Untersuchungen über die Hemmbarkeit der von P450 katalysierten Reaktionen.

(A) Induktion des mikrosomalen P450-Enzymsystems

Unter dem Begriff der Induktion versteht man einen Enzymaktivitätsanstieg nach Vorbehandlung mit verschiedenen Stoffen infolge vermehrter Enzymsynthese. Als Hauptinduktorsubstanzen verwendet man Phenobarbital (PB) und 3-Methylcholanthren (3-MC), die man jeweils den Tieren in vivo intraperitoneal appliziert. Anschließend an Beobachtungen, daß eine PB-Vorbehandlung von Ratten zu einer Steigerung des Arzneimittelstoffwechsels und einem gleichzeitigen Anstieg der Hämoproteinkonzentration in den Lebermikrosomen führt (Remmer und Merker, 1965), nach einer 3-MC-Vorbehandlung jedoch eine vermehrte Enzymaktivität (Äthylmorphin-Demethylase) trotz Steigerung der Hämoproteinkonzentration nicht nachzuweisen ist (Sladek und Mannering, 1966), zeigten Alvares et al. (1967), daß es nach 3-MC-Vorbehandlung in vivo zu einem "shift" des Absorptionsmaximums des mikrosomalen Enzyms von 450 nm nach 448 nm kam. Da dieser Effekt bei der in vitro-Gabe von 3-MC entfiel und eine Behandlung mit 3-MC und Äthionin in vivo den "shift" ebenfalls unterdrückte, äußerten die Autoren die Vermutung, daß es nach 3-MC-Vorbehandlung zu einer De-Novo-Synthese eines Hämoproteins käme, das sich von dem nach PB nachweisbaren unterscheide. Auch Shoeman et al. (1969) erhielten durch ihre Beobachtungen, daß eine PB-Vorbehandlung zu einer verstärkten Typ I- und Typ II-Bindung, 3-MC-Gabe nur zum Anstieg der Typ II-Bindung führte, Anhaltspunkte dafür, daß in dem durch PB-Vorbehandlung entstandenen Cytochrom Unterschiede zu demjenigen nach 3-MC-Vorbehand-

lung bestehen. Neben der Synthese eines "falschen" Hämoproteins dachten sie jedoch auch an Veränderungen in der Lipidumgebung des Enzymsystems oder an eine Besetzung der Typ I-Substratbindungsstellen durch 3-MC.

Bidleman und Mannering (1970) führten Simultanbehandlungen an Ratten mit PB und 3-MC durch und stützten an Hand ihrer Ergebnisse die These von Alvares et al. (1967). Auch bei der Durchführung von Gelelektrophoresen von teilweise gereinigtem Cytochrom P450 aus Lebermikrosomen von nicht vorbehandelten und mit PB bzw. 3-MC induzierten Ratten (Alvares und Siekevitz, 1973) zeigte sich in der verschiedenen Ausprägung der einzelnen Banden ein klarer Unterschied in der Induktionswirkung von PB und 3-MC.

Auf der Suche nach den Mechanismen, die dem Induktionseffekt von PB und 3-MC zugrundeliegen, postulierten Nebert et al. (1972) für die Maus die Abhängigkeit der 3-MC-Induktionswirkung auf die AHH vom Vorhandensein eines sog. AH-Locus auf einem Gen. Dieser Gen-Locus soll die Information für die Synthese eines Induktorproteins enthalten, das dann die Überführung eines Teiles des bereits vorhandenen Enzyms in die neue Form mit den veränderten spektralen und Metabolisierungseigenschaften bewirken könne. Eine gewisse Modifizierung erhält diese Ansicht aufgrund der Untersuchungen von Poland und Glover (1975), wonach 2,3,7,8-Tetrachlordibenz-p-Dioxin in genetisch nicht responsiven Mäusen einen Induktionseffekt auf die AHH bewirke. Hierzu waren allerdings 10-fach höhere Dosen als bei responsiven Mäusen erforderlich. Die Autoren versuchen dies damit zu erklären, daß

diese gegenüber nichtresponsiven Mäusen ebenfalls den AH-Locus besäßen, das in ihm codierte Rezeptorprotein, der Starter der Induktionswirkung, aber keine Affinität zu 3-MC und eine geringe zu dem Induktor habe. Was die Wirkungsweise von PB als Induktor angeht, so zeigten neuere Untersuchungen (Rajamanickam et al., 1975), daß die Apocytochrom-P450-Synthese auf dem Translationsniveau gesteigert wird, was wiederum eine Induktion der Delta-Aminolävulinsäuresynthetase und damit eine Steigerung der Hämsynthese bewirkt.

(B) Einfluß von Hemmstoffen auf das mikrosomale Enzymsystem.

Eine der am häufigsten untersuchten Hemmsubstanzen war SKF 525-A, der Di-Äthylamino-Äthanoylester der Diphenylpropylessigsäure. Untersuchungen von Rogers und Fouts (1964) führten zur Annahme, daß dem Wirkungsmechanismus dieser Substanz eine Bindung von SKF 525-A selbst oder eines seiner Metabolite an die Mikrosomenmembran zugrundeliegt. Dadurch komme es zu einer Permeabilitätsänderung für Arzneimittel.

Weiterführende Arbeiten zeigten, daß die hemmende Wirkung von SKF 525-A auf den Umsatz von Typ I-Substraten möglicherweise auf eine Besetzung der Bindungsstelle des Enzyms durch den Hemmstoff zurückzuführen sei (Anders und Mannering, 1966; Stitzel et al., 1966), die negative Beeinflussung des

Typ II-Substrat-Stoffwechsels jedoch durch eine Blockade des Redoxzyklus von Cytochrom P450 durch einen seiner Metabolite bedingt ist (Schenkman und Estabrook, 1969).

Was die Wirkungsweise eines anderen wichtigen Hemmstoffes, Metyrapon (2-Methyl-1,2-bis(3-Pyridyl)1-Propanon) betrifft, so vermuteten Netter et al. (1967) den Angriffspunkt in einer Störung der Einlagerung des aktivierten Sauerstoffes in das Akzeptormolekül. In weiteren Untersuchungen (Netter et al., 1969) wurde die Vorstellung entwickelt, daß Metyrapon mit O_2 in Konkurrenz um die Bindung an die Typ II-Substrat-Bindungsstelle stehe. Nach erfolgter Besetzung dieser Region durch Metyrapon käme es dann zu einer Konformationsänderung der Typ I-Bindungsstelle, was die Anlagerung und damit Metabolisierung von Typ I-Substanzen unmöglich mache.

In einer umfassenden Untersuchung über die Wirkung einer Vielzahl von Stoffen auf die Benzpyrenhydroxylierung durch die AHH unterteilten Goujon et al. (1972) die untersuchten Substanzen in fünf Gruppen: Die Stoffe der 1. Gruppe, die unter anderem auch Metyrapon enthält, hemmen die BP-Hydroxylierung, indem sie vorwiegend mit dem Cytochrom reagieren, das nach der PB-Induktion vorliegt (Cytochrom P450). Die 2. Gruppe weist Substanzen auf - darunter ANF -, die eine Hemmwirkung besonders durch Reaktion mit dem Cytochrom, das nach 3-MC-Induktion überwiegt (Cytochrom P_{1450}), ausüben. Die 3. Gruppe umfaßt Substanzen, die sowohl mit Cytochrom P450

als auch mit Cytochrom P₁450 reagieren und auf diese Weise auch hemmend auf den BP-Stoffwechsel wirken. Die 4. Gruppe beinhaltet Stoffe, die keinen erheblichen Einfluß auf den genannten Stoffwechsel haben. Als letzte Gruppe teilen die Autoren Hexachlorbenzol ab, das die AHH nur in PB- und nicht in 3-MC vorbehandelten oder Kontrollmikrosomen hemmt.

Ziel der Arbeit

1. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß einer Vorbehandlung von Ratten mit PB und 3-MC auf die 2- und 4-Hydroxylase von Biphenyl in Lebermikrosomen untersucht.
2. Es schließen sich Untersuchungen der von der AHH und der Biphenylhydroxylase unterschiedlich vorbehandelter Ratten katalysierten Reaktionen unter dem Einfluß der präferentiellen Inhibitoren MP und ANF an.
3. Es soll untersucht werden, ob die entgegengesetzte Wirkung von ANF und MP auf mit verschiedenen Induktoren stimulierten Mikrosomen auf Unterschiede in der Bindungsaffinität der Liganden zurückzuführen ist.

METHODEN

I. Herstellungen der Mikrosomenfraktion

1. Vorbehandlung

Vier Arten der Vorbehandlung von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (150 - 170 g) wurden angewandt: Eine Gruppe erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion von Natriumphenobarbital, 80 mg/kg, gelöst in 0.5 ml 0.9 %iger Kochsalzlösung. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die an den gleichen Tagen allein 0.5 ml des Lösungsmittels, 0.9 %ige Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert bekamen. Eine dritte Gruppe von Tieren erhielt - ebenfalls i.p. - eine Dosis von 20 mg pro kg Körpergewicht 3-MC suspendiert in 1 ml Sonnenblumenöl. Die vierte Gruppe erhielt allein die Menge von 3 x 1 ml Öl an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Den Ratten stand Wasser ad libitum zur Verfügung. Altromin^R-Trockenfutter (Firma Altromin, Lage/Lippe) wurde 12 Stunden vor der Tötung entzogen.

2. Aufbereitung

Nach Dekapitation wurden die Ratten gut ausgeblutet und die Lebern in situ mit eiskalter NaCl-Lösung (0.9 %ig) durch die Pfortader gespült, um die Erythrozyten herauszuwaschen, bis die Leber bei zusätzlicher Massage blass erschien (2 - 3 Min.). Anschließend wurden die Lebern gewogen und bis zum dreifachen Gewicht mit Saccharose-Ver-

sen-Tris (SVT)-Lösung ($\text{pH} = 7.4$) versetzt (Leybold und Staudinger, 1959). Im Kühlraum bei maximal 4°C wurden die Lebern mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und anschließend 15 Min. lang bei $1600 \times g$ und weitere 30 Min. bei $9000 \times g$ in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert, um Kerntrümmer und Mitochondrien zu entfernen. Der $9000 \times g$ Überstand wurde hierauf in einer Spinco L_265B Ultrazentrifuge 60 Min. lang bei $105000 \times g$ zentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment wurde in SVT-Lösung resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation unterworfen. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt und das Resediment nunmehr erneut in SVT-Lösung suspendiert und bei -20°C eingefroren.

3. Eiweißbestimmung

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Als Standard diente Lab-Trol^R (Dade Reagents Inc., USA). Nach Kenntnis des Eiweißgehalts wurden Portionen von 5 mg Mikrosomenprotein einzeln abgefüllt und erneut bei -20°C eingefroren, um eine möglichst standardisierte Alterung der für einen Ansatz erforderlichen Eiweißmenge nach dem Auftauen zu gewährleisten.

II. Enzymatische Bestimmungen

1. Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase (AHH)-Bestimmung - Beeinflussung durch Metyrapon und α -Naphthoflavin.

Die Bestimmung der AHH erfolgte in Anlehnung an die von Gielen et al. (1972) angegebene Methode. Sämtliche Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die im Eisbad stehenden dunkelgetönten 25 ml Erlenmeyerkolben enthielten 0.25 ml (bzw. 0.15 ml bei anschließender Metyraponzugabe) 0.2 M Trispuffer, pH = 7.25, 0.3 ml 0.1 M $MgCl_2$, 0.62 ml H_2O , 0.3 mg NADPH, 0.3 mg NADH und 0.7 mg Albumin. Metyrapon (MP) wurde in Trispuffer in einer Konzentration gelöst, so daß sich durch Zugabe von 100 μ l der Lösung im Ansatz eine MP-Konzentration von 10, 50 und 100 μ M ergab. α -Naphthoflavin (ANF) wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Das organische Lösungsmittel wurde vor Einfüllen des Inkubates mit Stickstoff bis zur Trockne eingedampft. Die auf das Volumen des Ansatzes berechnete Konzentration von ANF betrug 10, 50, 100, 400 und 800 μ M. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 μ l Mikrosomensuspension, die 0.2 mg Protein enthielt, zu allen Ansätzen mit Ausnahme der Leerwerte. In den Leerwerten erfolgte die Zugabe von Protein erst nach Abstoppen der Reaktion. Nach dem Einstellen der Proben in ein Wasserschüttelbad von 37°C wurde die Reaktion bei indirekter Beleuchtung durch Zugabe von 40 μ l 2 mM Benzpyrenlösung in Gang gesetzt. Nach 10 Min. stoppten wir die Benzpyrenhydroxylierung durch das Einpipettieren von

4. 25 ml eines kalten Hexan/Aceton-Gemisches (Hexan/Aceton = 1/1) und stellten die Kolben ins Eisbad zurück. Nach dem Aufsetzen von Glaskugeln wurden die Ansätze erneut ins Wasserbad von 37°C gestellt. Anschließend gossen wir die Proben in Schliffröhrchen (Volumen 13 ml) um und schüttelten 30 Sek. (20 Sek. mechanische Schüttelung, 10 Sek. Schütteln von Hand). Wir pipettierten dann 1 ml der oberen Phase ab und schüttelten 30 Sek. (20 Sek. mechanische Schüttelung, 10 Sek. Schütteln von Hand) mit 3 ml 1 N NaOH in einem Schliffröhrchen. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation mit 4800 Umdrehungen/min in der Heraeus Christ JJ 11 KS Zentrifuge. Anschließend wurde die obere Phase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aus der verbliebenen Bodenphase füllten wir 2.5 ml in Küvetten und führten sofort die Messung im Spektralphotofluorimeter PMQ II Zeiss bei der Exzitationswellenlänge von 396 nm und der Fluoreszenzwellenlänge von 522 nm durch. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit dem Fluoreszenzstandard.

2. Biphenylhydroxylierung - Beeinflussung durch Metyrapon und α -Naphthoflavin.

Die Bestimmung der Biphenylhydroxylierung erfolgte in Anlehnung an die von Creaven et al. (1965) angegebene Methode.

Die 25 ml Erlenmeyerkolben enthielten 0.25 ml 0.2 M Trispuffer, pH = 8.5, 0.03 ml 0.1 M $MgCl_2$, 0.62 ml H_2O , 0.1 mg NADPH, 0.7 mg NADH und 0.7 mg Albumin. Die Beschickung der Ansätze mit den Hemmstoffen

wurde in folgender Weise durchgeführt: Der erste und zweite Ansatz enthielt 10 bzw. 50 μl einer 1 mM Metyraponlösung, während in den dritten und vierten Ansatz 10 bzw. 100 μl der 10 mM Metyraponlösung gegeben wurden. Bei den Versuchen mit Öl-Kontrollmikrosomen wurde MP in Tris-puffer in einer Konzentration gelöst, so daß sich durch Zugabe von 100 μl der Lösung im Ansatz eine MP-Konzentration von 20, 100 und 500 μM ergab. Von ANF stellten wir eine 1.5 mM und 15 mM Lösung in DMF her. Anschließend gaben wir 10 μl der 1.5 mM und 5, 10 bzw. 40 μl der 15 mM ANF-Lösung in Erlenmeyerkolben. Das Lösungsmittel DMF wurde dann mit Stickstoff bis zur Trockne - vor Füllung der Kolben mit den eingangs erwähnten Reagenzien - eingedampft. Alle Versuche mit den Hemmstoffen MP und ANF wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Leerwerte benutzten wir 1.) einen Ansatz, der alle eingangs erwähnten Reagenzien enthielt, zu dem aber die Mikrosomen erst nach Abstoppen der Reaktion hinzugegeben wurden, 2.) einen Ansatz, der alle eingangs erwähnten Reagenzien und Mikrosomen und 3.) einen Ansatz, der alle eingangs erwähnten Reagenzien, Mikrosomen und ANF der höchsten Konzentration enthielt. Die Beschickung der Ansätze mit 100 μl Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml Ansatz) erfolgte im Anschluß an die Zugabe der eingangs erwähnten Reagenzien und des Hemmstoffes, mit Ausnahme des Leerwertes, zu dem die Mikrosomen erst nach Reaktionsstopp hinzugegeben wurden. Als Standards benutzten wir 40 μl einer 1 : 40 bzw. 1 : 80 verdünnten 45 mM 4-OH-Biphenyl-Lösung und 40 μl einer 45 mM 2-OH-Biphenyl-Lösung, zugegeben zu einem Erlenmeyerkolben, der die oben erwähnten Bestandteile - mit Ausnahme von

NADPH und NADH - enthielt. Sowohl zu diesen Standards als auch zu einem Standardgemisch aus 4-OH- und 2-OH-Biphenyl (1 : 80 verdünnte Lösung) mit Zugabe der höchsten Hemmstoffkonzentration wurden die Mikrosomen erst nach Abstoppen der Reaktion hinzugegeben. Nach diesen Vorbereitungen im Eisbad wurden die Proben, Leerwerte und Standards in ein Wasserschüttelbad von 37°C gestellt und die Reaktion mit der Zugabe von 40 µl einer 50 mM Biphenyl-Lösung zum Leerwert und zu den Proben gestartet. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei indirektem Licht wurden die Erlenmeyerkolben sofort wieder ins Eisbad zurückgestellt. Die Hydroxylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 0.5 ml kalter 1 N HCl gestoppt. Nach Zugabe von 100 µl Mikrosomensuspension zu Leerwerten und Standards und Hinzufügen von 4.0 ml n-Heptan zu jedem Ansatz wurden alle Kolben nach Verschluss mit Glaskugeln erneut für 10 Min. in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Kolbeninhalt in Schliffstopfen-Gläser von 13 ml überführt und für 30 Sek. geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation in der Heraeus-Christ-Zentrifuge JJ 11 KS mit 6000 U/min wurden aus der oberen (= Heptan-) Phase 3 ml abpipettiert und mit 4 ml 0.1 N NaOH 60 Sek. geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation (vgl. oben) wurde die organische Phase mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Von der unteren Phase, der NaOH-Phase, wurden 2 ml in frische Reagenzgläser pipettiert und 0.5 ml 0.5 N Bernsteinsäure hinzugegeben. Nach sorgfältiger Mischung stellte sich ein pH-Wert von etwa 5.5 ein. Anschließend führten wir die Messung am Fluoreszenzphotometer PMQ II Zeiss durch. Da die Proben höchstens 20 Minuten bei Zimmertemperatur

stehen dürfen, bereiteten wir zunächst nur die Hälfte der Proben vor. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit dem Fluoreszenzstandard bei folgender Einstellung: Erregermonochromator: 395 nm, Spalt: 1.0 mm, Fluoreszenzmonochromator: 533 nm, Spalt: 0.05 mm. Die Probenmessung wurde bei folgender Einstellung durchgeführt: Für 4-OH-Biphenyl: Erregermonochromator: 275 nm, Spalt: 1.0, Fluoreszenzmonochromator: 338 nm, Spalt: 1.0. Für 2-OH-Biphenyl: Erregermonochromator: 295, Spalt: 1.0, Fluoreszenzmonochromator: 415 nm, Spalt: 1.0. Jede Probe wurde zunächst bei beiden Einstellungen gemessen. Die Auswertung erfolgte nach Eichkurven unter Korrektur der bei 295/415 nm mit erfaßten Fluoreszenz von 4-OH-Biphenyl.

Die Eigenfluoreszenz von ANF (Anregung: 295 nm, Messung bei 415 nm) wurde durch Zugabe der höchsten ANF-Konzentration zu einem Leerwert kontrolliert. Da ihre Berücksichtigung in den Versuchen mit 3-MC-Mikrosomen lediglich zu einer Herabsetzung des Hemmeffektes um 10 % führte, wurde auf diesen Fehler nicht korrigiert.

III. Messung der oxydativen Bindungskonstanten

1. Bindung von α -Naphthoflavin (ANF)

Zur Bestimmung der oxydativen Bindungskonstanten K_s von ANF benutzten wir Tandemküvetten (Goujon et al., 1972). Dabei handelt es sich um Küvetten, in denen durch eine Trennwand zwei Kompartimente entstehen. Die dem Photomultiplier genäherten Abteilungen werden jeweils mit der

Mikrosomensuspension gefüllt, wohingegen die verbleibenden Hälften sowohl in der Probe- als auch in der Vergleichsküvette mit einer Albuminlösung beschickt werden. Bei der anschließenden Titration erfolgt die kumulative Zugabe der ANF-Lösung in der Probeküvette in die Mikrosomensuspension, in der Vergleichsküvette in das albuminhaltige Kompartiment. Das Lösungsmittel DMF wird in die übrigen Kompartimente gegeben. Diese Anordnung ermöglicht eine differenzspektroskopische Messung der Interaktion von Mikrosomen und ANF unter Ausschaltung der Eigenabsorption und evtl. auch der unspezifischen Bindung von ANF an Proteine.

Von einer Mikrosomensuspension von 2 mg/ml und einer Lösung von Rinder-serumalbumin (50 mg/ml) - Suspensions- bzw. Lösungsmittel war für beide Proteinarten ein 0.25 M Glycerinpuffer, pH 7.8 - wurden je 1.25 ml in die entsprechenden Kompartimente der Tandemküvetten eingebracht. Die Titration der Bindungskonstante K_s erfolgte durch kumulative Zugabe einer Lösung von ANF in DMF und entsprechender Volumina des Lösungsmittels in die entsprechenden Abteilungen der Küvetten. Am Ende der Titration waren zu dem Ausgangsvolumen in der Küvette von 1.25 ml 0.1 bis 0.14 ml der verschiedenen ANF-Lösungen (25 - 2.5 mM) bzw. von DMF zugegeben. Die auf das Küvettenvolumen berechneten Endkonzentrationen lagen zwischen 10 und 1500 μM .

Die Auswertung erfolgte nach Ermittlung der Absorptionsdifferenz zwischen Maximum und Minimum des Differenzspektrums unter Berücksichtigung von Absorptionsdifferenzen der Basislinie - zunächst graphisch durch Auftragung

der reziproken Werte in einem Lineweaver-Burk-Diagramm. Für die maschinelle Ermittlung einer Regressionslinie zur Berechnung der Bindungskonstante wurden die reziproken Werte in einen Wang 700A-Rechner eingegeben. Es wurden nur Werte bis zum Erreichen des maximalen spektralen Effektes in die Berechnung einbezogen.

Um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse der ANF-Bindung durch die Gegenwart des Lösungsmittels DMF zu kontrollieren, wurde in einigen Versuchen das Lösungsmittel nach Eingabe eines bestimmten Volumens der ANF-Lösung in ein Reagenzglas unter Stickstoff abgedampft. Der trockene Rückstand von ANF wurde in einem den Tandemküvetten entnommenen Aliquot der Mikrosomensuspension bzw. der Eiweißlösung durch sorgfältiges Umherschwenken verteilt, anschließend in die entsprechenden Kompartimente zurückgeführt und mit dem übrigen Küvetteninhalt vermischt. Im Vergleich zu den Titrationen mit dem in DMF gelösten ANF ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede, so daß für die Ermittlung der Bindungskonstanten das genauere Verfahren mit der Zugabe von definierten Volumina der ANF-Lösung verwendet wurde.

2. Bindung von Metyrapon (MP)

Die Titration der Bindungskonstanten von MP erfolgte ebenfalls kumulativ. Es wurden normale Küvetten von 1 cm Lichtweg benutzt. In Meß- und Referenzküvette wurde je 2.5 ml einer Mikrosomensuspension von 1 mg Protein/ml 0.25 M Glycerin-Phosphat-Puffer (pH = 7.8) eingebracht. Die

Zugabe von MP zur Probeküvette bzw. von Glycerin-Phosphat-Puffer zur Referenzküvette führte zu einer Erhöhung des Küvetteninhaltes um 0.2 - 0.3 ml. Die Auswertung erfolgte wie bei der Bindungskonstanten von ANF graphisch und rechnerisch unter Verwendung der Meßpunkte bis zum Erreichen des maximalen spektralen Effektes.

IV. Chemikalien

Alle verwendeten Substanzen waren von analytischem Reinheitsgrad. 3-Methylcholanthren bezogen wir von Eastman Kodak Co., Rochester N.Y., USA. Phenobarbital-Natrium, die Bestandteile der SVT-Lösung (Tris, Na^+ -EDTA, Saccharose), MgCl_2 , Azeton, Hexan, Dimethylformamid, NaOH, NaCl, HCl, Heptan, K_2HPO_4 , Methanol, Glycerin und KH_2PO_4 stammten von der Firma Merck, Darmstadt. NADH und NADPH waren Präparate der Firma Boehringer, Mannheim. Rinderserumalbumin bezogen wir bei den Behring-Werken, Marburg/Lahn. α -Naphthoflavon stammte von EGA-Chemie, Keppler und Reif, 7924 Steinheim. Metyrapon war ein Geschenk der Ciba Pharmaceutical Company, Summit N.J., USA. Biphenyl, das zweimal mit Äthanol rekristallisiert war, bekamen wir von BDH-Chemicals, Poole, Dorset, England, geschenkt. 4-OH-Biphenyl und 2-OH-Biphenyl, ebenfalls zweimal mit Äthanol rekristallisiert, erhielten wir als Geschenk von Hopkins and Williams Ltd., England. Benzpyren bezogen wir von Aldrich-Europe, Beerse, Belgien. Benzol stammte aus der Hausapotheke der Universität Mainz.

V. Statistische Auswertung

Als Versuchsergebnisse werden Einzelwerte angegeben. Zur Beurteilung der oxydativen Bindungskonstanten von ANF und MP in PB- und 3-MC-vorbehandelten Ratten auf statistische Unterschiede wurde nach Berechnung der arithmetischen Mittelwerte und der Summe der quadratischen Abweichungen der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben durchgeführt.

Bei der Angabe der Werte der 4- und 2-Hydroxylase-Aktivität von Biphenyl in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten handelt es sich um Mittelwerte. Zur Beurteilung der Enzymaktivität in PB- bzw. 3-MC-stimulierten Tieren und den jeweiligen Kontrolltieren auf statistische Unterschiede wurde ebenfalls der t-Test nach Student für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Rechnungen erfolgten maschinell auf einem Rechner Wang 700A nach Programmen des Pharmakologischen Institutes.

ERGEBNISSE

1. Induktion der Biphenyl-Hydroxylase in Rattenlebermikrosomen

Aus Tabelle 1 läßt sich entnehmen, daß eine PB-Vorbehandlung von Ratten zu einem Anstieg der 2-Hydroxylaseaktivität von 0.11 auf 0.4 nMol/mg Protein x min und der 4-Hydroxylaseaktivität von 2.8 auf 4.49 nMol/mg Protein x min führt. Nach 3-MC-Gabe kommt es ebenfalls zu einer Steigerung der 2-Hydroxylaseaktivität von 0.14 auf 2.4 nMol/mg Protein x min und der 4-Hydroxylaseaktivität von 3.16 auf 5.53 nMol/mg Protein x min.

Vorbehandlung	2-OH-BIPHENYL nMol/mg Protein x min	4-OH-BIPHENYL nMol/mg Protein x min
Öl	0.14 $\pm$ 0.02 (11)	3.16 $\pm$ 0.67 (11)
NaCl	0.11 $\pm$ 0.01 (3)	2.8 $\pm$ 0.25 (3)
3-MC	2.4 $\pm$ 0.1 ^{**}) (15)	5.53 $\pm$ 0.27 ^{**}) (15)
PB	0.4 $\pm$ 0.04 ^{**}) (9)	4.49 $\pm$ 0.38 [*]) (10)

Tabelle 1: Induktion der Biphenylhydroxylase in Rattenlebermikrosomen. Die Werte stellen das arithmetische Mittel $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes dar.

Werte in Klammern=Anzahl der Versuche.

t-Test gegen die entsprechenden Kontrollwerte:

^{*}) P < 0.05, ^{**}) P < 0.001.

2. Einfluß von Metyrapon auf die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in Mikrosomen
von unterschiedlich vorbehandelten Ratten.

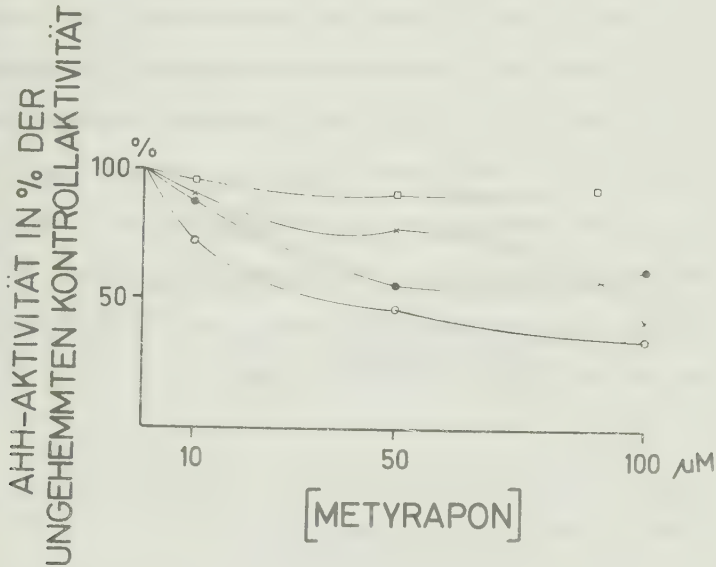


Abb. 1. Einfluß von Metyrapon auf die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in
Mikrosomen unterschiedlich stimulierter Ratten.

Die Mikrosomensuspension (0.2 mg/ml) von unterschiedlich vorbehandelten Ratten wurde in Gegenwart von NADPH und NADH mit 80 μM Benzpyren in Tris-puffer (pH = 7.85) 10 Minuten lang bei 37° C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Metyrapon bzw. ohne Metyrapon inkubiert. Die Werte stellen die Ergebnisse der fluorimetrischen Messung in % der Aktivität der Bezugswerte ohne Hemmstoff dar. (• NaCl, x Öl, ° PB, □ 3-MC).

Aus der Betrachtung der Abb. 1 ergibt sich für die Beurteilung des Einflusses von Metyrapon auf die verschiedenen Mikrosomen folgendes: In MC-vorbehandelten Mikrosomen erreicht die AHH in Anwesenheit von Metyrapon in Konzentrationen zwischen 10 - 100 μM noch zwischen 90 und 93 % der ungehemmten Kontrollaktivität. In Öl-Kontrollmikrosomen wird unter steigender Metyraponkonzentration nur noch 90 - 42 % der ungehemmten Kontrollaktivität erreicht. In NaCl-Kontrollmikrosomen zeigt sich eine ähnliche Tendenz, wobei die Enzymaktivität auf 88 - 60 % der Vergleichsaktivität ohne Hemmstoff abfällt. Den stärksten Einfluß übt Metyrapon auf die AHH-Aktivität in PB-Mikrosomen aus, wo bei der höchsten Metyraponkonzentration nur noch zwischen 45 - 35 % der Vergleichsaktivität erreicht werden.

3. Einfluß von α -Naphthoflavin auf die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten.

Aus der Abb. 2 läßt sich erkennen, daß sowohl in Öl-Kontroll- als auch in PB-Mikrosomen trotz hoher ANF-Konzentration (800 μM) ein Absinken auf nur 89 % der ungehemmten Kontrollaktivität erreicht wird. In MC-Mikrosomen zeigt sich bereits bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 μM eine Halbhemmung. Bei 100 μM ANF-Lösung ist mit 27 % Hemmung fast die gleiche Inhibition wie bei der höchsten ANF-Konzentration (21 %) erreicht.

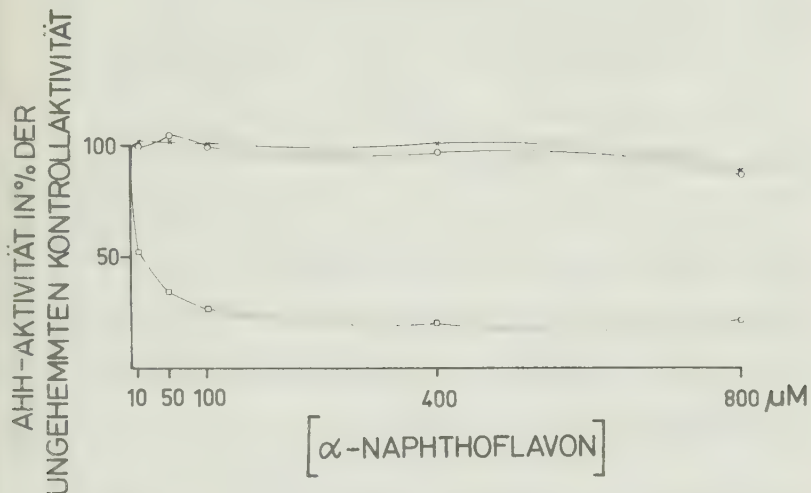


Abb. 2. Einfluß von α -Napthoflavon auf die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase in Mikrosomen unterschiedlich stimulierter Ratten.

Die Mikrosomensuspension (0.2 mg/ml) von unterschiedlich vorbehandelten Ratten wurde in Gegenwart von NADPH und NADH mit 80 μ M Benzpyren in Trispuffer (pH = 7.85) 10 Minuten lang bei 37°C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von ANF bzw. ohne ANF inkubiert. Die Werte stellen die Ergebnisse der fluorimetrischen Messung in % der Aktivität der Bezugswerte ohne Hemmstoffe dar. (x Öl, o PB, □ 3-MC)

4. Einfluß von α -Naphthoflavin auf die Biphenylhydroxylierung in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten.

Wie aus der Betrachtung der Tabelle 2 hervorgeht, hemmt ANF sowohl die 4- als auch die 2-Hydroxylierung von Biphenyl in 3-MC-vorbehandelten Tieren. Im Falle der 4-Hydroxylierung ergibt sich eine Aktivitätsminderung von 4.26 bzw. 5.51 nMol/mg Protein x min auf Werte von 0.7 bzw. 1.0 nMol/mg Protein x min, was einer Hemmung von etwa 83.6 bzw. 81.8 % entspricht. Bei der 2-Hydroxylierung zeigt sich ein Rückgang der Enzymaktivität von 2.17 auf 0.37 bzw. von 2.1 auf 0.35 nMol/mg Protein x min, was ebenfalls eine Hemmung von über 80 % bedeutet.

Im Vergleich zu 3-MC-vorbehandelten Tieren zeigt sich bei Vorbehandlung mit PB keine einheitliche Wirkung von ANF auf die 4- und 2-Hydroxylierung (vgl. Tab. 3). Die 4-Hydroxylierung wird in geringem Maße durch ANF gehemmt, von 5.16 bzw. 4.93 nMol/mg Protein x min sinkt die Umsatzrate auf 4.55 bzw. 3.3 nMol/mg Protein x min ab. Dies entspricht einer Hemmung von 11.8 bzw. 33.1 %. Bei der 2-Hydroxylierung kommt es dagegen nach anfänglicher geringer Hemmung in Konzentrationsbereichen von 15 - 75 μ M ANF zu einer Steigerung der Substratumsatzrate von 0.35 auf 0.83 bzw. 0.4 auf 0.63 nMol/mg Protein x min, was einem Anstieg der Enzymaktivität um 137.1 bzw. 57.5 % entspricht.

Tabelle 2: Einfluß von ANF auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen 3-MC-vorbehandelter Ratten.

	1. Mikrosomenpräparation (1.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (18.9.75)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	4.26	2.17	100	100	5.51	2.10	100	100
15 µM ANF	2.65	1.23	62.2	56.7	3.74	1.36	67.9	64.8
75 "	1.06	0.30	24.9	13.8	1.35	0.30	24.5	14.3
150 "	0.82	0.25	19.2	11.5	0.86	0.22	15.6	10.5
600 "	0.7	0.37	16.4	17.1	1.00	0.35	18.2	16.7

Mikrosomenprotein (1 mg/ml) von 3-MC-vorbehandelten Ratten wurde in Gegenwart von NADPH und NADH mit 2 mM Biphenyl in Trispuffer (pH = 8.5) 10 Minuten bei 37°C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von ANF bzw. ohne ANF inkubiert. Die Werte stellen die Ergebnisse der fluorimetrischen Messung dar.

Tabelle 3: Einfluß von ANF auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen PB-vorbehandelter Ratten.

	1. Mikrosomenpräparation (1.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (18.9.75)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	5.16	0.35	100	100	4.93	0.40	100	100
15 µM ANF	5.26	0.34	101.9	97.1	4.50	0.32	91.3	80
75 "	4.55	0.34	88.2	97.1	4.13	0.4	83.8	100
150 "	4.75	0.54	92.1	154.3	3.62	0.48	73.4	120
600 "	4.55	0.83	88.2	237.1	3.3	0.63	66.9	157.5

Es wurde 1 mg/ml Mikrosomenprotein von PB-vorbehandelten Ratten eingesetzt. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung vgl. Tabelle 2 und "Methoden".

Ähnlich den PB-Mikrosomen zeigt sich in Öl-Kontrollmikrosomen (vgl. Tab. 4) bei der höchsten ANF-Konzentration eine Hemmung der 4-Hydroxylierung von 22.7 bzw. 20.5 %. Auch der Einfluß von ANF auf die 2-Hydroxylierung ist demjenigen auf die PB-Mikrosomen vergleichbar, denn es zeigt sich - bereits in niedrigen Konzentrationen beginnend - eine Steigerung der Enzymaktivität von 0.33 auf 0.51 bzw. von 0.07 auf 0.49 nMol/mg Protein x min, was einen prozentualen Anstieg von 54.4 bzw. 600 bedeutet. In NaCl-Kontrollmikrosomen (vgl. Tab. 5) zeigt sich, wie bei den Öl-Kontrollmikrosomen eine hemmende Wirkung von ANF auf die 4-Hydroxylierung, die bei 28.1 bzw. 34.8 % liegt. Bei der 2-Hydroxylierung macht sich ein den PB-Mikrosomen vergleichbarer ANF-Einfluß bemerkbar, der im Konzentrationsbereich von 15 µM zu einer 11.1 % Hemmung, in höheren Konzentrationen jedoch zu einer Steigerung der Enzymaktivität auf 176.9 bzw. 333.3 % führt.

Tabelle 4: Einfluß von ANF auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen Öl-vorbehandelter Ratten.

		1. Mikrosomenpräparation (19.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (9.10.75)			
		nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
		4-OH-BI-PH.	2-OH-BI-PH.	4-OH-BI-PH.	2-OH-BI-PH.	4-OH-BI-PH.	2-OH-BI-PH.	4-OH-BI-PH.	2-OH-BI-PH.
Kontrolle		2.07	0.33	100	100	2.64	0.07	100	100
15 µM ANF		2.03	0.11	98.1	33.3	2.55	0.12	96.6	171.4
75 "		1.82	0.18	87.9	54.5	2.31	0.3	87.5	428.5
150 "		1.60	0.39	77.3	118.2	2.20	0.37	83.3	528.5
600 "		1.6	0.51	77.3	154.5	2.1	0.49	79.5	700

Es wurde 1 mg/ml Mikrosomenprotein von Ratten, die nur Sonnenblumenöl erhalten hatten, eingesetzt. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung vgl. Tabelle 2 und "Methoden".

Tabelle 5: Einfluß von ANF auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen NaCl-vorbehandelter Ratten.

	1. Mikrosomenpräparation (1.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (20.10.75)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	2.31	0.13	100	100	3.13	0.09	100	100
15 μ M ANF	-	-			2.68	0.08	85.6	88.9
75 "	1.8	0.13	77.9	100	2.47	0.15	78.9	166.7
150 "	1.66	0.14	71.9	107.7	2.22	0.21	70.9	233.3
600 "	1.66	0.23	71.9	176.9	2.04	0.30	65.2	333.3

Es wurde 1 mg/ml Mikrosomenprotein von Ratten, die nur NaCl-Lösung (0.9 %) erhalten hatten, eingesetzt. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung vgl. Tabelle 2 und "Methoden".

5. Einfluß von Metyrapon auf die Biphenylhydroxylierung in Mikrosomen von unterschiedlich vorbehandelten Ratten.

Anhand der Tabelle 6 läßt sich erkennen, daß MP eine ähnliche Wirkung auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in 3-MC-Mikrosomen hat. Für beide Metabolisierungswege zeigt sich, daß Metyrapon im Bereich von 10 - 100 μ M keinen ausgeprägten Effekt hat, wohingegen in Konzentrationen von 1000 μ M eine Hemmung der 4-Hydroxylierung von 16.4 bis 28.6 % und der 2-Hydroxylierung zwischen 33.6 und 40.2 % vorliegt. In PB-vorbehandelten Mikrosomen (vgl. Tab. 7) wird die Biphenylhydroxylaseaktivität durch MP gleichmäßig gehemmt. Bei der 4-Hydroxylierung sinkt die Umsatzrate von 4.35 bzw. 4.99 auf 2.51 bzw. 3.43 nMol/mg Protein x min ab, das entspricht einer Hemmung

von 42.3 bzw. 31.3 %. Bei der 2-Hydroxylierung ist der hemmende Effekt von MP in noch ausgeprägterem Maße vorhanden und erreicht ein Ausmaß von 66.7 und 59.5 %.

Tabelle 6: Einfluß von MP auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen 3-MC-vorbehandelter Ratten.

	1. Mikrosomenpräparation (18.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (1.9.75)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	6.1	2.23	100	100	7.98	3.51	100	100
10 µM MP	6.1	2.23	100	100	-	-		
50 "	6.31	2.22	103.4	99.6	6.84	2.81	85.7	80.1
100 "	6.16	2.0	101	89.7	7.22	3.08	90.5	87.2
1000 "	5.10	1.48	83.6	66.4	5.7	2.1	71.4	59.8

Mikrosomenprotein (1 mg/ml) von 3-MC-vorbehandelten Ratten wurde in Gegenwart von NADPH und NADH mit 2 mM Biphenyl in Trispuffer ($\text{pH}_\text{p} = 8.5$) 10 Minuten bei 37°C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von MP bzw. ohne MP inkubiert. Die Werte stellen die Ergebnisse der fluorimetrischen Messung dar.

Sowohl in NaCl- als auch in Öl-Kontrollmikrosomen (vgl. Tab. 8) zeigt sich der Hemmeffekt von MP auf beide Hydroxylierungen von Biphenyl. Die 4-Hydroxylierung erreicht - nach geringer Hemmung bei MP-Konzentrationen von 10- 100 µM (7 % in NaCl-Kontrollmikrosomen, 5 % in Öl-Kontrollmikrosomen) - ein Ausmaß von 17 % (NaCl-Kontrollmikrosomen, 1 mM MP) und 24.5 % (Öl-Kontrollmikrosomen, 500 µM). Bei der 2-Hydroxylierung zeigt MP bereits in Konzentrationen von 10- 100 µM eine ausgeprägte Hemmung von 40 % (NaCl-Kontrollmikrosomen) und

Tabelle 7: Einfluß von MP auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen PB-vorbehandelter Ratten.

	1. Mikrosomenpräparation (18.9.75)				2. Mikrosomenpräparation (25.9.75)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	4.35	0.51	100	100	4.99	0.37	100	100
10 µM MP	3.6	0.33	82.8	64.7	4.32	0.28	86.6	75.7
50 "	3.15	0.27	72.4	52.9	3.85	0.22	77.2	59.5
100 "	2.69	0.19	61.8	37.3	3.64	0.17	72.9	45.9
1000 "	2.51	0.17	57.7	33.3	3.43	0.15	68.7	40.5

Es wurde 1 mg/ml Mikrosomenprotein von PB-vorbehandelten Ratten eingesetzt. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung vgl. Tabelle 6 und "Methoden".

Tabelle 8: Einfluß von MP auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Mikrosomen NaCl- und Öl-vorbehandelter Ratten.

	Präparation von NaCl-Mikrosomen (25.9.1975)				Öl-Mikrosomen (27.1.76)			
	nMol/mg Prot. x min		%		nMol/mg Prot. x min		%	
	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.	4-OH- BI-PH.	2-OH- BI-PH.
Kontrolle	3.0	0.1	100	100	3.1	0.17	100	100
10 µM MP	2.85	0.05	95	50				
20 "					2.95	0.14	95.2	82.4
50 "	2.89	0.07	96.3	70				
100 "	2.78	0.06	92.7	60	2.95	0.1	95.2	58.9
500 "					2.34	0.1	75.5	58.9
1000 "	2.49	0.07	83	70				

Es wurde 1 mg/ml Mikrosomenprotein von NaCl (0.9 %)- und Öl-vorbehandelten Ratten eingesetzt. Weitere Angaben zur Versuchsdurchführung vgl. Tabelle 6 und "Methoden".

41.1% (Öl-Kontrollmikrosomen). Erhöht man die MP-Konzentration auf 1 mM (NaCl-Kontrollmikrosomen) und 500 μ M (Öl-Kontrollmikrosomen), so zeigt sich bei den Öl-Kontrollmikrosomen keine Zunahme des Hemmeffektes, wohingegen bei NaCl-Kontrollmikrosomen eine Abnahme des Hemmeffektes um 10 % zu erkennen ist.

6. Oxydative Bindungskonstanten von α -Naphthoflavon in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten.

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, lassen sich keine eindeutigen Unterschiede in der Affinität von ANF zu 3-MC- und PB-Mikrosomen feststellen. Während sich bei einigen Mikrosomenchargen in ANF-Konzentrationsbereichen zwischen 20 - 80 - 840 μ M ein Verhältnis $K_s \text{ PB} / K_s \text{ MC}$ von knapp 2 ergibt, zeigt eine andere Titration in ähnlichen Bereichen 50 - 800 μ M angenähert gleiche Bindungskonstanten. Gleiches gilt für die angeführten Titrations im weiten Bereich von 10 - 1490 bzw. 1390 μ M. Nach Bildung des Mittelwertes der oxydativen Bindungskonstanten von ANF in 3-MC- und PB-Mikrosomen und anschließender Durchführung des ungepaarten t-Testes nach Student zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den oxydativen Bindungskonstanten der beiden Mikrosomentypen.

7. Oxydative Bindungskonstanten von Metyrapon in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten.

Tabelle 10 zeigt die oxydativen Bindungskonstanten von MP in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten. Nach Bildung des Mittelwertes der

oxydativen Bindungskonstanten von MP in 3-MC- und PB-Mikrosomen und anschließender Durchführung des ungepaarten t-Testes zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den oxydativen Bindungskonstanten der beiden Mikrosomentypen.

Tabelle 9: Oxydative Bindungskonstanten von ANF in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten.

Vorbehandlung mit	Bereich der Titration (μM ANF)	Oxydative K_s (μM)
3-MC	20 - 840	20
	20 - 840	14
	80 - 840	17
	50 - 800	108
	50 - 800	87
	10 - 1490	23
	10 - 200	25
PB	20 - 840	34
	20 - 840	25
	50 - 800	39
	50 - 800	89
	10 - 1390	26
	10 - 911	16
Öl	20 - 800	101
	20 - 800	49
NaCl	20 - 800	168
	20 - 800	56

Mikrosomenprotein (2 mg/ml) von unterschiedlich vorbehandelten Ratten und Rinderserumalbumin (50 mg/ml) wurden auf die entsprechenden Kompartimente der Tandemküvetten verteilt. Anschließend erfolgte die Titration durch kumulative Zugabe einer ANF-Lösung in DMF bzw. des Lösungsmittels DMF. Die Bindungskonstanten wurden aus der maschinell ermittelten Regression über die reziproken Werte bestimmt (Auswertung bei 391 nm gegen 420 nm).

Tabelle 10: Oxydative Bindungskonstanten von MP in Mikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten.

Vorbehandlung mit	Bereich der Titration (μM MP)	Oxydative K_s (μM)
3-MC	25 - 5000	45
	25 - 6250	30
	25 - 6250	37
	25 - 6250	54
PB	25 - 6500	45
	25 - 6500	18
	25 - 6500	26
	50 - 4925	21
Öl-Kontrolle	25 - 6250	76
	25 - 11250	75
NaCl-Kontrolle	25 - 6250	29
	25 - 11250	75

In Meß- und Referenzküvette befand sich die Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml) von unterschiedlich vorbehandelten Ratten. Anschließend erfolgte die Titration durch kumulative Zugabe einer MP-Lösung in Glycerin-Phosphat-Puffer (pH = 7.8) bzw. des Lösungsmittels Glycerin-Phosphat-Puffer. Die Bindungskonstanten wurden aus der maschinell ermittelten Regressionslinie über die reziproken Werte berechnet (Auswertung bei 397 nm gegen 428 nm).

DISKUSSION

1. Einfluß der Vorbehandlung mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren auf die 4- und 2-Hydroxylierung von Biphenyl in Rattenlebermikrosomen.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, konnten wir zeigen, daß sowohl PB- als auch 3-MC-Vorbehandlung einen Induktionseffekt auf die 4- und 2-Hydroxylase von Biphenyl in Rattenlebermikrosomen hat. Nach PB-Gabe kam es in der 2-Hydroxylase-Aktivität zu einem Anstieg von 0.11 auf 0.4 nMol/mg Protein x min (= 3.6 facher Anstieg), und die 4-Hydroxylase stieg von 2.8 auf 4.49 nMol/mg Protein x min (= 1.6 facher Anstieg). Für die 3-MC-Vorbehandlung ließ sich in der 2-Hydroxylase eine Aktivitätssteigerung von 0.14 auf 2.4 nMol/mg Protein x min (= 17.1 facher Anstieg) und in der 4-Hydroxylase-Aktivität von 3.16 auf 5.53 nMol/mg Protein x min (= 1.8 facher Anstieg) feststellen.

Diese Ergebnisse sind teilweise gegensätzlich zu Angaben von Creaven und Parke (1966). Diese Autoren beobachteten eine klare Korrelation zwischen Vorbehandlung und den einzelnen Biphenyl-Hydroxylase-Typen: Während eine PB-Gabe überwiegend die 4-Hydroxylase von Biphenyl stimuliert und nur einen geringen Effekt auf die 2-Hydroxylase habe, führe eine Vorbehandlung mit 3-MC zu gerade umgekehrten Verhältnissen. Diese bevorzugte Induktion der 2-Hydroxylase nach 3-MC-Gabe konnten wir bestätigen, allerdings verzeichneten wir im Gegensatz zu den genannten Autoren, die einen 2.5fachen Enzymanstieg angaben, eine Aktivitätssteigerung der 2-Hydroxylase um

das 17 fache. In der 4-Hydroxylase-Aktivität konnten wir - auch im Gegensatz zu Creaven und Parke, die die Stimulation mit 0 % angaben - einen Anstieg um das 1.8 fache der Kontrollaktivität nachweisen. Zur Klärung dieser Diskrepanzen könnten folgende Unterschiede im Versuchsaufbau von Creaven und Parke und uns herangezogen werden:

1. Das Alter der Ratten: Die britischen Autoren arbeiteten mit Ratten von 50 - 70 g. Wie sie selbst herausgefunden haben, findet sich die 2-Hydroxylase besonders in jungen Tieren. Diese sind daher bevorzugt in der Lage, mit einer Induktion dieses Enzyms durch 3-MC zu reagieren. Unser in der Tendenz gleiches Ergebnis läßt sich damit erklären, daß eben nicht nur das junge Tier, sondern auch die erwachsene Ratte über die 2-Hydroxylase verfügt. Auch Hook et al. (1975) bestätigten dies. Darüberhinaus erwähnen Creaven und Parke (1966), daß polyzyklische Kohlenwasserstoffe, die als Kanzerogene gelten, ganz besonders die 2-Hydroxylase, eindeutig nicht-kanzerogene Stoffe der gleichen Klasse, keine der beiden Hydroxylasen induzierten, und polyzyklische Kohlenwasserstoffe mit schwacher oder zweifelhafter Kanzerogenität eine Zwischenstellung einnehmen, und eine mäßige Hydroxylase-Induktion, vorherrschend der 2-Hydroxylase, bewirkten. Somit drängt sich der Verdacht einer möglichen Korrelation zwischen 2-Hydroxylase-Induktion und Kanzerogenität der sie verursachenden Stoffe auf. Da der tierische Organismus mit zunehmendem Alter immer mehr Kontakt mit Kanzerogenen hat, könnte man sich vorstellen, daß die Induzierbarkeit seines 2-Hydroxylase-Systems zunehmend sensibilisiert wird, um bei mäßiger Grundaktivität im Be-

darfsfall stark anzusteigen. Hierdurch läßt sich vielleicht der ausgeprägte Induktionseffekt unserer älteren Tiere erklären.

2. Die Verabfolgung der 3-MC: Creaven und Parke verabreichten den Tieren eine einmalige intraperitoneale Injektion von 1 mg 3-MC (17 mg/kg KG) 24 Stunden vor Durchführung der Experimente. Wir hingegen gaben über 3 Tage 20 mg/kg Körpergewicht (etwa 3.4 mg/Tag). Möglicherweise führt diese protrahierte Kanzerogengabe zu ausgeprägteren Induktionseffekten als die einmalige Injektion.

3. Unterschiede in den Rattenstämmen: Hook et al. (1975) beobachteten - ebenso wie wir - eine 2-Hydroxylase-Aktivität in Kontroll-Ratten unterschiedlichen Alters. Diese Autorengruppe äußert jedoch die Vermutung, daß dieser Gegensatz zu der Publikation Creaven und Parke auf Unterschiede in den untersuchten Rattenstämmen zurückzuführen sei. (Hook et al.: Albino rats of the Charles River Stock, Creaven und Parke: Wistar Albino rats, unsere Ratten: Sprague-Dawley-Ratten).

Zur Klärung des von uns - im Gegensatz zu Creaven und Parke - gefundenen Anstiegs der 4-Hydroxylase nach 3-MC-Gabe um das 1.8-Fache, könnte die erwähnte Arbeit von Hook et al. (1975) herangezogen werden. Die Autoren untersuchten die Induktionswirkung von 2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenz-p-Dioxin auf die beiden Hydroxylasetypen von Biphenyl. Dabei machten sie die Beobachtung, daß es bei der Induktion der 4-Hydroxylase zu einem Hydroxylasetyp kommt, dessen K_m -Wert erhöht war und sich demjenigen der 2-Hydroxylase näherte. Sie äußerten die Vermutung, daß es sich bei diesem Induktions-

vorgang um ein Enzym handle, das sowohl in Position 4 als auch in Position 2 hydroxyliert und sich von der 4-Hydroxylase von Kontrolltieren durch eine "offenere" Struktur - vielleicht durch Membranveränderungen bedingt - unterscheidet. Während die Autoren noch die Übertragung dieser Vermutung auf die 3-MC-Vorbehandlung bezweifelten - als Unterschiede zwischen TCDD und 3-MC ziehen sie das von uns widerlegte Unvermögen von 3-MC, die 4-Hydroxylase zu induzieren, heran - neigen wir dazu, die Hypothese der Autoren auf die 3-MC-Vorbehandlung zu übertragen, zumal beide Stoffe P448 induzieren (Hook et al., 1975). Wahrscheinlich ist jedoch, daß diese Form der 4-Hydroxylase-Induktion erst mit zunehmendem Alter entwickelt oder erworben wird und somit in den von Creaven und Parke (1966) untersuchten Tieren noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Im Fall der 4-Hydroxylase-Induktion nach PB-Gabe stimmen unsere Ergebnisse fast mit den von Creaven und Parke publizierten Daten überein: Induktionsfaktor (PB-4-OH/NaCl-4-OH): 1.8 und 1.6 (eigenes Ergebnis). Bei der 2-Hydroxylase stellten wir einen Induktionsfaktor von 3.6 gegenüber 1.6 bei den britischen Autoren fest. Dieser Unterschied läßt sich möglicherweise auf die Verwendung junger Tiere zurückführen. Es gibt Untersuchungen von Schledde (1974), in denen eine Altersabhängigkeit des Ausmaßes des PB-Induktionseffektes zumindest für die Benzpyren-Hydroxylase und Äthylmorphin-N-Demethylase in Wistar-Ratten - dem von den oben zitierten Autoren ebenfalls benutzten Rattenstamm - nachgewiesen wurde. Joannides und Parke (1975) untersuchten ebenfalls den Einfluß einer PB-Vorbehandlung auf die 4-Hydroxylase in Ratteniebertmikrosomen. Obwohl unsere Werte zahlenmäßig

mehr als doppelt so hoch sind (verschiedene Rattenstämme?), ergibt sich ein fast identischer Induktionsfaktor (PB-4-OH/NaCl-4-OH) von 1.7 bzw. 1.6 (eigene Ergebnisse). Irgendwelche Angaben über das Verhalten der 2-Hydroxylase nach PB-Vorbehandlung werden von diesen Autoren jedoch nicht gemacht. Prough und Burke (1975) veröffentlichten in einer Arbeit über immunologische Hemmung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase katalysierten Biphenylhydroxylierungsreaktionen Werte der 2-Hydroxylase-Aktivität nach PB in Hamsterlebermikrosomen. Daraus ergibt sich ein Induktionsfaktor für 4- und 2-Hydroxylierung von 3.9 bzw. 1.3. Da unsere Ergebnisse denjenigen nach 3-MC-Vorbehandlung ähneln, könnte man vermuten, daß sie entweder auf dem P 450-Anteil beruhen, der auch nach 3-MC-Inaktrion von P 448 noch vorhanden ist, oder daß es auch nach PB-Vorbehandlung zu einer geringen Induktion von P 448 kommt. Durch die letzte Vermutung könnte man auch den im Vergleich zur 3-MC-Gabe etwa 4-fach schwächeren Anstieg der 2-Hydroxylase erklären.

2. Einfluß von Metyrapon und α -Naphthoflavin auf die 2- und 4-Hydroxylase von Biphenyl und die Benzpyrenhydroxylase in unterschiedlich vorbehandelten Rattenlebermikrosomen.

In unseren Untersuchungen über den Einfluß von MP und ANF auf die genannten Enzymreaktionen (vgl. Tabellen 2-8 und Abb. 1, 2) zeigt sich deutlich, daß ANF sowohl in der Biphenyl- als auch in der BP-Hydroxylierung in 3-MC-Mikrosomen einen stark hemmenden Effekt hat. Ähnliches gilt für MP in PB-vorbehandelten Mikrosomen. Wie ebenfalls aus unseren Ergebnissen (vgl. Ta-

belln 9 und 10) hervorgeht, lassen sich diese Unterschiede in der Reaktion auf den Hemmstoff nicht auf verschiedene Bindungsaffinitäten der Liganden zurückführen.

2a) Einfluß von ANF auf AHH und Biphenyl-Hydroxylierung:

Wie Goujon et al. (1972) in ihrer Arbeit über den Einfluß von verschiedenen Hemmstoffen auf die AHH in Mikrosomen von PB-, 3-MC-vorbehandelten und Kontroll-Mäusen zeigten, entfaltet ANF nur in 3-MC-vorbehandelten responsiven Mäusen einen starken Hemmeffekt auf etwa 17 % der ungehemmten Kontrollaktivität. Nach PB-Gabe sank die AHH-Aktivität nur auf 75 % und in Kontrolltieren war keine Hemmung festzustellen. Bis auf geringe Unterschiede im Ausmaß der Hemmung durch ANF in PB-Tieren (eigenes Ergebnis: 90 %), die möglicherweise speziesbedingt sind - wir arbeiteten mit Ratten - konnten wir die Ergebnisse der Autoren bestätigen. Vergleicht man unsere Ergebnisse der Biphenylhydroxylierung mit den genannten Daten, so läßt sich erkennen, daß sowohl die 2- als auch die 4-Hydroxylase von Biphenyl in 3-MC-vorbehandelten Ratten genau wie die AHH in diesen Tieren durch ANF um 80 % gehemmt wird. Seit der Arbeit von Alvares et al. (1967) ist bekannt, daß eine 3-MC-Vorbehandlung zum Überwiegen des Cytochroms P 448 über Cytochrom P 450 führt. Wiebel und Gelboin (1975) gelang eine Zuordnung dieses Phänomens zu dem der Induktion einer AHH in Ratten, die stark durch ANF gehemmt wurde. Auch Goujon et al. (1972) ordneten in der erwähnten Arbeit ANF als einen Hemmstoff ein, der speziell mit dem α^* -P 450, welches nach 3-MC-Gabe vorliege (Nebert et al., 1972), reagiere. Somit muß man annehmen,

daß der Cytochromtyp, der nach 3-MC-Gabe vorliegt, in gleicher Weise die Benzpyren- und Biphenyl-Hydroxylierung katalysiert und äußerst empfindlich auf den hemmenden Einfluß von ANF reagiert. Im Gegensatz zu Goujon et al. (1972), die keine Hemmung der AHH durch ANF in Kontroll-Mikrosomen nachweisen konnten, was wir bestätigten (90 % der ungehemmten AHH-Kontroll-Aktivität bei hohen ANF-Konzentrationen im Versuch mit Ratten noch vorhanden), zeigte sich in unseren Experimenten, vgl. Tab. 4 und 5, in der 4-Hydroxylierung von Biphenyl eine Hemmung zwischen 20 bzw. 35 %, in der 2-Hydroxylierung sogar eine Aktivitätssteigerung von 54, 77, 233 bzw. 600 %. Somit ähneln diese Daten denjenigen, die wir nach PB-Gabe ermittelten. Hierbei zeigte sich in der 4-Hydroxylierung von Biphenyl, vgl. Tab. 3, eine Hemmung durch ANF zwischen 12 und 33 %, in der 2-Hydroxylierung wiederum ein Aktivitätsanstieg um 57.5 bzw. 137 %. Über mögliche Wirkungsmechanismen lassen sich nur Vermutungen äußern: Die einheitliche Reaktion von AHH und der beiden Hydroxylasetypen von Biphenyl in 3-MC-Mikrosomen läßt denselben Hemmungsmechanismus von ANF vermuten. Wie Wiebel und Gelboin (1975) aus Kinetiken der durch ANF gehemmten AHH schlossen, könnte zumindest in niedrigen ANF-Konzentrationen eine kompetitive Hemmung vorliegen. Für höhere Konzentrationsbereiche von ANF vermuten wir eine Bindung von ANF an die Proteinkomponente des Cytochroms P 448, das nach 3-MC-Gabe überwiegt, und daraus resultierend eine Konformationsänderung, die zu einer erschwerten Anlagerung von Biphenyl und Benzpyren führt. In PB-Mikrosomen könnte die im Vergleich zu 3-MC-Mikrosomen schwächer ausgeprägte

Hemmung der 4-Hydroxylase von Biphenyl ebenfalls auf Konformationsänderungen zurückzuführen sein. Diese zuletzt erwähnten Strukturänderungen sind wohl auch in 3-MC-Mikrosomen vorhanden, werden dort aber möglicherweise von ausgeprägteren Veränderungen am Cytochrom P 448 überlagert. Der stimulierende Effekt von ANF wurde bereits von Wiebel und Gelboin (1975) für einen AHH-Typ, der durch PB induzierbar sei, erkannt. Da sich in den von uns untersuchten Reaktionen, die 2-Hydroxylase in Kontroll- und PB-Mikrosomen ähnlich verhält, müssen die ANF-bedingten Veränderungen weitgehend PB-unabhängig sein. Man könnte sich ein Cytochrom vorstellen, das sowohl in Kontroll- als auch in PB-vorbehandelten Tieren vorhanden ist. Die Lokalisation der 4- und 2-Hydroxylase müßte man sich so vorstellen, daß eine durch ANF-Bindung an den Proteinanteil des Cytochroms bedingte Konformationsänderung zu einer Verschlechterung der 4-Hydroxylase- und Verbesserung der 2-Hydroxylaseaktivität führe. Nach PB-Gabe entstehen verschiedene Cytochromunterordnungen (Ryan et al., 1975). Da der 2-Hydroxylase-Stimulierungseffekt im Vergleich zur Kontrolle geringer wird, besteht die Möglichkeit, daß in den Untergruppencytochromen ANF auch eine Hemmwirkung hat, die aber im Zusammenspiel mit dem vor PB-Gabe vorherrschenden Cytochrom nur zu einer Abnahme der Induktion führt.

Neben den oben diskutierten Reaktionsmöglichkeiten von ANF mit Cytochrom P 450 bzw. P 448 lassen sich auch Spekulationen über Angriffspunkte des Hemmstoffes auf die Elektronentransportkette anstellen. ANF könnte mit der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase reagieren und diese hierdurch inaktivieren.

In PB-Mikrosomen, wo neben einem erhöhten P 450-Gehalt auch eine induzierte Reduktase vorliegt (Parke, 1975), wird die Hemmung durch die Induktion des Enzyms ausgeglichen, in 3-MC-Mikrosomen, wo die Reduktase nicht induziert wird, überwiegt der hemmende Einfluß auf beide Hydroxylasetypen. Die in Gegenwart von ANF gesteigerte 2-Hydroxylierung von Biphenyl in PB-Mikrosomen läßt sich nicht nur mit dem Überwiegen der Induktion über die Reduktasehemmung erklären, sondern erfordert die zusätzliche Berücksichtigung der oben diskutierten Punkte. Durch die mögliche Inaktivierung der Reduktase beeinflußt ANF auch die NADH-abhängige Hydroxylierung, denn mindestens ein Elektron muß über die Reduktase eingeschleust werden (Prough und Burke, 1975). Wie aus der zitierten Arbeit, auf sich allerdings mit der immunologischen Reduktasehemmung befaßt, hervorgeht, zeigt sich die Parallellität zwischen Reduktasehemmung und der Beeinträchtigung der NADH-abhängigen Hydroxylierung in MC-Mikrosomen von Ratten. Auch hier wäre eine mögliche Erklärung für den starken Einfluß von ANF auf die genannten Enzymreaktionen gegeben.

Auch an eine Beeinflussung von Cytochrom b_5 als Elektronenvernittler im mischfunktionellen Oxydase- und Desaturase-System (Correia und Mannering, 1973) durch ANF wäre zu denken. Unter ANF wäre in 3-MC-Mikrosomen ein überwiegender Elektronentransport zum Fettsäure-Desaturase-System anzunehmen, während in PB-Mikrosomen eine Bevorzugung der mischfunktionellen Oxydase zu vermuten wäre.

Möglicherweise fungiert ANF als Elektronenakzeptor für die - wie Lind und Ernster (1974) zeigten - nach 3-MC-Gabe induzierte DT-Diaphorase. Liegt

durch vermehrt anfallende NADP hat eine hemmende Wirkung auf das NADH- und NADPH-abhängige System der Biphenylhydroxylierung (Prough und Burke, 1975). In PB-Mikrosomen ohne DT-Diaphorase-Induktion ist das anfallende NADP, wenn ANF als Elektronenakzeptor dient, geringer. Überträgt man weiterhin die Vermutung von West et al. (1974), daß in PB-Mikrosomen die BP-Hydroxylierung überwiegend über NADPH abläuft, auf die Biphenylhydroxylase, so ergibt sich eine Konkurrenz von ANF und der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase um das Elektron von NADPH. Infolge der durch PB-Gabe bedingten Steigerung der Reduktaseaktivität wird es ANF erst in hohen Konzentrationen gelingen, durch Elektronenabzug hemmend einzugreifen. Die gesteigerte 2-Hydroxylierung könnte man auf dieser Ebene nur damit erklären, daß trotz des ANF-Eingriffs die Reduktaseinduktion überwiegt.

2b) Einfluß von MP auf AHH und Biphenylhydroxylierung:

In Übereinstimmung mit Goujon et al. (1972) konnten wir auch nach 3-MC-Vorbehandlung für beide Hydroxylasetypen von Biphenyl, vgl. Tab. 6, nur eine schwache Hemmung durch MP nachweisen. Wie schon bei ANF fällt auch im Ansprechen auf MP die gleichmäßige Reaktion der beiden Biphenyl-Hydroxylasen auf. Somit läßt sich vermuten, daß nach 3-MC-Gabe ein Cytochrom vorliegt, bei dem die 2- und 4-hydroxylierenden und BP-hydroxylierenden Enzyme eng benachbart lokalisiert sein müssen, um auf die mögliche Bindung von ANF an den Proteinanteil und die daraus resultierende Konformationsänderung des Hämanteils in gleicher Weise zu reagieren. Nach PB-Gabe zeigte sich auch in unseren Ergebnissen - in Übereinstimmung mit Goujon et al.

(1972) - eine ausgeprägte Hemmung der AHH, vgl. Abb. 1. Bei der Biphenylhydroxylierung reagierte die 2-Hydroxylase wie die AHH auf MP mit einer 60 - 67 %igen Hemmung, vgl. Tab. 7, die 4-Hydroxylase wird jedoch nur um etwa 30 - 40 % gehemmt. In unbehandelten Tieren fanden wir nach MP-Gabe in der AHH wie die obengenannten Autoren ein fast gleiches Verhalten wie nach PB-Vorbehandlung. Bei den beiden Biphenyl-Hydroxylasetypen zeigte sich ohne Vorbehandlung - in der Tendenz - ein ähnliches Ergebnis wie nach PB-Gabe. Allerdings war der Hemmeffekt von MP in Kontrolltieren, vgl. Tab. 8, nur etwa halb so groß wie in PB-stimulierten Ratten. Somit tritt hier ein Unterschied zwischen Kontroll- und PB-vorbehandelten Tieren im Gegensatz zu ANF klar hervor. Geht man von der Vorstellung von Nebert et al. (1972) aus, daß sich Kontroll- und PB-Mikrosomen nur quantitativ aber nicht qualitativ unterscheiden, so wäre bei gleicher MP-Konzentration wie in den Kontrolltieren eine Abnahme der Hemmwirkung zu erwarten, falls die Hemmstoffkonzentration durch die höhere P 450-Menge relativ zu niedrig wäre. Bei unserer millimolaren MP-Konzentration ist mit einer solchen Limitierung jedoch nicht zu rechnen. Orientiert man sich jedoch an dem oben erwähnten Artikel von Ryan et al., so wäre vorstellbar, daß nach PB-Gabe ein Cytochrom oder eine Cytochromgruppe vorliegt, die bevorzugt Biphenyl hydroxyliert und eine hohe Affinität zu MP hat, das entweder über Konformationsänderungen oder vielleicht sogar über einen kompetitiven Mechanismus wirken könnte.

Zusammenfassung

1. Sowohl 3-MC- als auch PB-Vorbehandlung von Ratten führt zu einer Induktion der 2- und 4-Hydroxylase von Biphenyl in Lebermikrosomen. Für die 3-MC-Vorbehandlung läßt sich in der 2-Hydroxylase eine Aktivitätssteigerung von 0.14 auf 2.4 nMol/mg Protein x min (= 17.1 facher Anstieg) und in der 4-Hydroxylase-Aktivität von 3.16 auf 5.53 nMol/mg Protein x min (= 1.8 facher Anstieg) feststellen. Nach PB-Gabe kommt es zu einem Anstieg der 2-Hydroxylase-Aktivität von 0.11 auf 0.4 nMol/mg Protein x min (= 3.6 facher Anstieg), und die 4-Hydroxylase steigt von 2.8 auf 4.49 nMol/mg Protein x min (= 1.6 facher Anstieg).
2. ANF führt in 3-MC-Mikrosomen zu einer Hemmung der 2- und 4-Hydroxylase von Biphenyl von über 80 %. In PB-Mikrosomen wird die 4-Hydroxylase von Biphenyl um 12 bzw. 33 % (zwei verschiedene Mikrosomenpräparationen) gehemmt, in der 2-Hydroxylase kommt es durch ANF zu einer Aktivitätssteigerung um 58 bzw. 137 %. Öl-Kontroll-Mikrosomen werden in der 4-Hydroxylase-Aktivität durch ANF auch um 20 bzw. 23 % gehemmt, während in der 2-Hydroxylase ein Aktivitätsanstieg von 55 bzw. 600 % zu verzeichnen ist. Ähnlich verhalten sich NaCl-Mikrosomen, wo sich in der 4-Hydroxylase nach ANF-Zugabe eine Hemmung von 28 bzw. 35 % zeigt, während die 2-Hydroxylase von Biphenyl in ihre Aktivität um 77 bzw. 233 % gesteigert ist.

3. Metyrapon (MP) zeigt in 3-MC-Mikrosomen eine mäßige Hemmung der 4-Hydroxylase von Biphenyl von 16 bzw. 29 % und der 2-Hydroxylase von 34 bzw. 40 %. In PB-Mikrosomen können wir nach MP-Gabe eine Hemmung der 4-Hydroxylase von 31 bzw. 42 % feststellen, während die 2-Hydroxylase zwischen 60 bzw. 67 % gehemmt wird. In Kontrollmikrosomen führt MP zu einer Hemmung der 4-Hydroxylase von 17 % (NaCl-Kontrolle) und 24.5 % (Öl-Kontrolle). Bei der 2-Hydroxylase ist nach MP-Gabe sowohl in NaCl- als auch in Öl-Kontrollmikrosomen eine Hemmung von 40 % zu erkennen.
4. Obwohl aus unseren Versuchen hervorgeht, daß ANF die Biphenylhydroxylase besonders stark in Mikrosomen nach 3-MC-Gabe hemmt, und Metyrapon - wenn auch nicht so ausgeprägt - seinen hemmenden Einfluß besonders in PB- und Kontrollmikrosomen entfaltet, lassen sich keine Unterschiede in der Bindungsaffinität der Liganden zu den nach 3-MC- bzw. PB-Gabe vorliegenden Cytochromen aufzeigen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W. und KUNTZMAN, R.:
Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes
by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem. Biophys. Res.
Commun.* 29, 521-526 (1967).
- ALVARES, A.P. und SIEKEVITZ, P.: Gel electrophoresis of partially purified
cytochromes P 450 from liver microsomes of variously-treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 923-929 (1973).
- ANDERS, M.W. und MANNERING, G.J.: Inhibition of drug metabolism:
I. Kinetics of the inhibition of the N-demethylation of ethylmorphine
by 2-diethylaminoethyl 2,2-diphenylvalerate HCl (SKF 525 A) and re-
lated compounds. *Mol. Pharmacol.* 2, 319-327 (1966).
- BIDLEMAN, K. und MANNERING, G.J.: Induction of drug metabolism:
V. Independent formation of cytochromes P 450 and P₁450 in rats treated
with phenobarbital and 3-methylcholanthrene simultaneously. *Mol.
Pharmacol.* 6, 697-701 (1970).
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317-366 (1967).
- CORREIA, M.A. und MANNERING, G.J.: Reduced diphosphopyridine nucleo-
tide synergism of the reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent
mixed-function oxidase system of hepatic microsomes. I. Effects of acti-
vation and inhibition of the fatty acyl coenzyme A desaturase system.
Mol. Pharmacol. 9, 455-469 (1973).
- CREAVEN, P.J., PARKE, D.V. und WILLIAMS, R.T.: A fluorimetric study of
the hydroxylation of biphenyl in vitro by liver preparations of various
species. *Biochem. J.* 96, 879-885 (1965).
- CREAVEN, P.J. und PARKE, D.V.: The stimulation of hydroxylation by carcino-
genic and non-carcinogenic compounds. *Biochem. Pharmacol.* 15,
7-16 (1966).

- ERNSTER, L. und ORRENIUS, S.: Substrate induced synthesis of the hydroxylating system of liver microsomes. *Fed. Proc.* 24, 1190-1199 (1965).
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958).
- GIELEN, J.E., GOUJON, F.M. und NEBERT, D.W.: Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple mendelian expression in mouse tissues in vivo. *J. Biol. Chem.* 247, 1125-1137 (1972).
- GOUJON, F.M., NEBERT, D.W. und GIELEN, J.E.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. IV. Interaction of various compounds with different forms of cytochrome P 450 and the effect on benzpyrene metabolism in vitro. *Mol. Pharmacol.* 8, 667-680 (1972).
- HOOK, G.E.R., ORTON, T.C., MOORE, J.A. und LUCIER, G.W.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in the hydroxylation of biphenyl by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 24, 335-340 (1975).
- IOANNIDES, D. und PARKE, D.V.: Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates. *J. Pharm. Pharmacol.* 27, 739-746 (1975).
- KUNTZMAN, R., JACOBSON, M., SCHNEIDMAN, K. und CONNEY, A.H.: Similarities between oxidative drug-metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 146, 280-285 (1964).
- LEYBOLD, K. und STAUDINGER, HJ.: Geschlechtsunterschiede im Steroidstoffwechsel von Rattenlebermikrosomen. *Biochem. Zschr.* 331, 389-398 (1959).
- LIND, C. und ERNSTER, L.: A possible relationship between DT-diaphorase and the aryl-hydrocarbon hydroxylase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 392-400 (1974).

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- LU, A.Y.H. und COON, M.J.: Role of hemoprotein P 450 in fatty acid hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 243, 1331-1332 (1968).
- NEBERT, D.W., GIELEN, J.E. und GOUJON, F.M.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. III. Changes in the binding of n-octylamine to cytochrome P 450. *Mol. Pharmacol.* 8, 651-666 (1972).
- NETTER, K.J., JENNER, S. und KAJUSCHKE, K.: Über die Wirkung von Metyrapon auf den mikrosomalen Arzneimittelabbau. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 259, 1-16 (1967).
- NETTER, K.J., KAHL, G.F. und MAGNUSSEN, M.P.: Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 265, 205-215 (1969).
- OMURA, T. und SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964).
- PARKE, D.V.: Induction of drug-metabolizing enzymes. In: *Enzyme Induction*, 207-271, Editor: D.V. Parke, London: Plenum Press, 1975.
- POLAND, A. und GLOVER, E.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Evidence for a receptor mutation in genetically non-responsive mice. *Mol. Pharmacol.* 11, 389-398 (1975).
- PROUGH, R.A. und BURKE, M.D.: The role of NADPH-cytochrome c reductase in microsomal hydroxylation reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 160-168 (1975).

- RAJAMANICKAM, C., RAO, M.R.S. und PADMANABAN, G.: On the sequence of reactions leading to cytochrome P 450 synthesis-effect of drugs. *J. Biol. Chem.* 250, 2305-2310 (1975).
- REMMER, H. und MERKER, H.J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 123, 79-97 (1965).
- ROGERS, L.A. und FOUTS, J.R.: Some of the interactions of SKF-525-A with hepatic microsomes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 146, 286-293 (1964).
- RYAN, D., LU, A.Y.H., WEST, S. und LEVIN, W.: Multiple forms of cytochrome P 450 in phenobarbital- and 3-methylcholanthrene-treated rats. Separation and spectral properties. *J. Biol. Chem.* 250, 2157-2163 (1975).
- SCHENKMAN, J.B., REMMER, H. und ESTABROOK, R.W.: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3, 113-123 (1967).
- SCHENKMAN, J.B. und ESTABROOK, R.W.: Evidence for combination of a product of SKF 525 A and SKF 26754A metabolism with the heme of cytochrome P-450. *International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation, Tübingen, July 19-22, 1969. Abstracts.*
- SCHLEDE, E.: Varying effect of phenobarbital on hepatic drug metabolism in rats of different ages. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 282, 311-315 (1974).
- SHOEMAN, D.W., CHAPLIN, M.D. und MANNERING, G.J.: Further evidence for the formation of a new P 450 hemoprotein after treatment of rats with 3-MC. *Mol. Pharmacol.* 5, 412-419 (1969).
- SLADEK, N.E. und MANNERING, G.J.: Evidence for a new P 450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 668-674 (1966).

- STITZEL, R.E., ANDERS, M.W. und MANNERING, G.J.: Inhibition of drug metabolism. III. Inhibition of hexobarbital metabolism in the intact rat and in the isolated perfused liver by 2-diethylaminoethyl 2,2 diphenylvalerate HCl (SKF 525 A) and its N-deethylated derivatives. *Mol. Pharmacol.* 2, 335-340 (1966).
- WEST, S.B., LEVIN, W., RYAN, D., VORE, M. und LU, A.Y.H.: Liver microsomal electron transport system. I. The involvement of cytochrome b_5 in the NADH-dependent hydroxylation of 3,4-benzpyren by a reconstituted cytochrome P 448-containing system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 516-522 (1974).
- WIEBEL, F.J. und GELBOIN, H.V.: Aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in liver from rats of different age, sex and nutritional status. Distinction of two types by 7,8-benzoflavone. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1511-1515 (1975).

Lebenslauf

Am 21. November 1950 wurde ich als erstes Kind des Universitätsprofessors Hans Galinsky und seiner zweiten Ehefrau Ilse Galinsky, geb. Freeb, in Tübingen geboren. Nach Berufung meines Vaters an die Universität Mainz siedelte unsere Familie 1953 nach Mainz über, wo ich 1956 in der Volksschule Mainz-Zahlbach eingeschult wurde. Nach dem 4. Schuljahr wechselte ich auf die Maria-Ward-Schule, Neusprachlicher Zweig, über, wo ich am 10. Juni 1969 das Abitur ablegte. Am 8. Oktober 1969 begann ich das Medizinstudium an der Universität Mainz und, nach Studiensemestern in Lübeck und Würzburg, beendigte ich am 3. Juli 1975 das Medizinstudium an der Universität Mainz.

Die Untersuchungen zum Thema dieser Arbeit begann ich im August 1975 am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz.

